



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

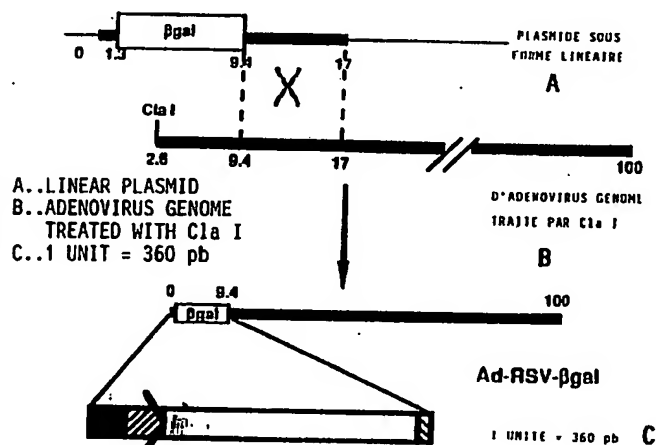
(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/86, A61K 48/00 C12N 15/12, 9/68	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/06223 (43) Date de publication internationale: 1er avril 1993 (01.04.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00898 (22) Date de dépôt international: 25 septembre 1992 (25.09.92) (30) Données relatives à la priorité: 91/11947 27 septembre 1991 (27.09.91) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75007 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 20, résidence du Moulin, F-28150 Ouarville (FR). BRIAND, Pascale [FR/FR]; 10, rue du Docteur-Roux, F-75015 Paris (FR). STRATFORD-PERRICAUDET, Leslie [FR/FR]; 20, résidence du Moulin, F-28150 Ouarville (FR).		(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc. ; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 67, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>

(54) Title: VIRAL RECOMBINANT VECTORS FOR EXPRESSION IN MUSCLE CELLS**(54) Titre: VECTEURS RECOMBINANTS VIRAUX POUR L'EXPRESSION DANS DES CELLULES MUSCULAIRES****(57) Abstract**

Non-replicable viral recombinant vectors which are recognizable by muscle cell receptors, and furthermore modified by an insertion nucleic acid coding for a polypeptide sequence to be expressed in said muscle cells, are used to obtain a drug for treating muscle cell diseases or diseases which, by virtue of their location in the body, are accessible to the products of the expression of the above mentioned nucleotide sequence, as secreted by said muscle cells. A method for producing said vectors, vectors such as those described above, and their use in pharmaceutical compositions are also provided.

(57) Abrégé

L'invention concerne l'utilisation de vecteurs recombinants d'origine virale, non répliquables, et susceptibles d'être reconnus par les récepteurs de cellules musculaires, ces vecteurs étant en outre modifiés par un acide nucléique d'insertion codant pour une séquence polypeptidique dont l'expression dans lesdites cellules musculaires est recherchée, pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de pathologies affectant les cellules musculaires ou de pathologies dont la localisation dans l'organisme les rendent accessibles aux produits de l'expression de la séquence nucléotidique sus-mentionnée secrétés par lesdites cellules musculaires. L'invention concerne également un procédé d'obtention de ces vecteurs, et des vecteurs tels que décrits ci-dessus et leur utilisation dans des compositions pharmaceutiques.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FI	Finlande	MN	Mongolie
AU	Australie	FR	France	MR	Mauritanie
BB	Barbade	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgique	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GN	Guinée	NO	Norvège
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	HU	Hongrie	PL	Pologne
BR	Brésil	IE	Irlande	PT	Portugal
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CH	Suisse	KR	République de Corée	SE	Suède
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	République slovaque
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	SU	Union soviétique
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TD	Tchad
DE	Allemagne	MG	Madagascar	TG	Togo
DK	Danemark	ML	Mali	UA	Ukraine
ES	Espagne			US	Etats-Unis d'Amérique

VECTEURS RECOMBINANTS VIRAUX POUR L'EXPRESSION DANS DES CELLULES MUSCULAIRES

L'invention concerne des vecteurs recombinants d'origine virale comportant une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide déterminé, et leur utilisation pour l'expression de ce polypeptide dans des cellules musculaires. L'invention vise également un procédé d'obtention de ces vecteurs, ainsi que leurs applications, notamment en tant que médicaments dans le domaine des pathologies musculaires.

Le problème, non résolu jusqu'à maintenant, de la diffusion directe d'un gène vers un tissu spécifique, fait obstacle au développement de la thérapie génique dans le domaine des maladies musculaires.

Les diverses tentatives de modification du tissu musculaire réalisées jusqu'à ce jour sont principalement celle de la fusion de cellules musculaires avec un muscle hôte (Salminen, A., et al., Hum. Gene Ther. 2, 15-26 (1991); Partridge, T.A., et al., Nature 337, 176-179 (1989)), et celle procédant par injection d'ADN directement dans les muscles (Wolff, J.A. et al. Science 247, 1465-1468 (1991); Acsadi, G., New Biol. 3, 71-81 (1991)).

La méthode procédant par fusion, chez des souris, de précurseurs de cellules musculaires provenant d'un donneur normal, avec des fibres musculaires d'un hôte (Partridge, T.A., et al. cité ci-dessus) a été réalisée avec succès et cette thérapie cellulaire a fait l'objet d'essais préliminaires chez des enfants. Toutefois, cette approche semble présenter trop d'inconvénients pour être applicable au traitement de pathologies musculaires. En effet, les capacités de

migration de ces précurseurs de cellules étant réduites à quelques millimètres, l'implantation cellulaire de ces derniers nécessiterait des millions d'injections pendant des heures d'anesthésie. De manière inévitable, des problèmes immunologiques, conduisant à des phénomènes de rejet, risqueraient d'apparaître, comme dans le cas de nombreuses greffes. De plus le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) nécessite non seulement d'atteindre les muscles du squelette, mais également les cellules myocardiques; on imagine aisément les difficultés susceptibles d'être rencontrées pour implanter des précurseurs de cellules musculaires dans le myocarde. La thérapie cellulaire semble par conséquent peu appropriée pour le traitement de cellules malades présentant une telle dissémination dans l'organisme .

La thérapie génique par introduction directe in vivo d'acides nucléiques à l'intérieur d'organes, est une méthode attrayante en raison de sa simplicité, mais dont le développement se heurte à un certain nombre d'obstacles. En particulier, l'expression de gènes dans les muscles reste localisée au point d'injection (Wolff, J.A., et al. cité ci-dessus) et semble être assez limitée dans le temps, particulièrement dans le muscle cardiaque (Acsadi, G. et al., cité ci-dessus).

Le but de la présente invention est précisément de permettre l'introduction d'un très grand nombre d'acides nucléiques dans un nombre important (jusqu'à 50 % et plus) de cellules musculaires d'un organisme humain ou animal, que ces cellules musculaires soient celles des muscles du squelette ou encore celles du myocarde.

La présente invention a plus particulièrement pour but de permettre l'acheminement de ces acides nucléiques vers les cellules musculaires cibles par la

circulation sanguine, tout en protégeant ces acides nucléiques de l'agression de divers constituants sanguins.

Un autre but de la présente invention est de mettre à la disposition du public des compositions pharmaceutiques permettant le traitement des maladies musculaires, et plus particulièrement des pathologies génétiques du système musculaire, ou encore de pathologies dont la localisation dans l'organisme les rendent accessibles aux produits de l'expression des acides nucléiques sus-mentionnés, ces produits étant sécrétés par lesdites cellules musculaires.

La présente invention découle de la découverte faite par les inventeurs, du fait que l'on retrouve l'activité β -galactosidase dans de nombreux tissus après injection à des souris de vecteurs recombinants d'origine virale, plus particulièrement d'adénovirus, dans le génome desquels a été inséré le gène codant pour la β -galactosidase. Parmi ces tissus, on peut citer les poumons, le foie, l'intestin, le coeur et les muscles du squelette. L'expression du gène de la β -galactosidase est constante dans le temps, puisque la proportion des cellules de couleur bleue (coloration obtenue à la suite de l'expression de ce gène) dans le tissu musculaire est à peu près équivalente d'un mois à un autre.

La figure 1 représente un exemple de construction d'un vecteur recombinant selon l'invention et correspondant à l'adénovirus de type Ad5 dans le génome duquel est inséré le gène de la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV.

La présente invention a pour objet l'utilisation de vecteurs recombinants d'origine virale, non répliquables, et susceptibles d'être reconnus par les récepteurs de cellules musculaires, humaines ou animales, infectables par ces virus, ces vecteurs

étant en outre modifiés par un acide nucléique d'insertion contenant une séquence nucléotidique codant pour une séquence polypeptidique dont l'expression dans lesdites cellules musculaires est recherchée, cette séquence étant sous le contrôle d'un promoteur reconnu par les polymérases de ces cellules, pour l'obtention d'un médicament administrable par la voie générale, notamment intra-veineuse ou intra-artérielle, et destiné au traitement de pathologies affectant les cellules musculaires ou de pathologies dont la localisation dans l'organisme les rendent accessibles aux produits de l'expression de la séquence nucléotidique sus-mentionnée et secrétés par lesdites cellules musculaires.

Les adénovirus, notamment les adénovirus humains de type 2 ou 5 représentent des vecteurs particulièrement préférés dans le cadre de la présente invention, en raison notamment de la grande taille du fragment d'ADN étranger qu'il est possible d'insérer dans le génome de ces virus.

Avantageusement, l'acide nucléique d'insertion sus-mentionné est compris dans un génome défectif d'adénovirus, ce génome étant dépourvu de séquences essentielles nécessaires à la répllication de ces adénovirus, et plus particulièrement des transactivateurs EA et EB; ce génome comprend néanmoins préférentiellement l'ensemble de celles des séquences essentielles nécessaires à l'encapsidation de ces adénovirus.

Le promoteur mis en oeuvre peut être un promoteur endogène (par exemple un promoteur précoce ou tardif de l'adénovirus utilisé) ou exogène.

On aura avantageusement recours à l'utilisation de promoteurs forts, par exemple ayant une force de l'ordre de grandeur du promoteur contenu dans le LTR (Long Terminal Repeat) de RSV (Rous Sarcome Virus).

A titre d'exemples d'autres promoteurs dont l'utilisation peut être envisagée, on mentionnera :

- le promoteur du gène IE de CMV (cytomégalovirus)
- les promoteurs inductibles MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) ou métallothionine.

La force du promoteur utilisable peut être appréciée dans des essais semblables à ceux qui sont décrits dans les exemples qui suivent, par exemple par substitution dans les vecteurs de ces exemples du promoteur étudié au promoteur contenu dans le LTR de RSV et par l'évaluation de l'intensité d'expression du marqueur obtenu, intensité qui peut alors être comparée à celle obtenue avec le promoteur de LTR de RSV.

La quantité de vecteurs administrée dans l'organisme est avantageusement choisie de manière à déborder le système immunitaire de l'organisme dans lequel ils sont injectés.

Avantageusement la voie d'administration choisie dans le cadre de la présente invention est la voie intra-veineuse ou intra-artérielle.

Parmi les pathologies affectant des cellules musculaires sus-mentionnées, on peut citer des pathologies génétiques telles que la dystrophie musculaire.

A ce titre l'acide nucléique inséré dans le génome du vecteur viral, et dont est recherchée la diffusion dans la masse musculaire, comprend une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide susceptible de traiter la pathologie en question, et plus particulièrement de jouer le rôle dans la cellule musculaire du polypeptide normalement présent dans une cellule saine, mais dont la déficience est due soit à une production anormalement faible, voire nulle, de ce polypeptide, soit à une erreur dans sa séquence en

acides aminés résultant d'anomalies d'ordre génétique dans sa séquence nucléotidique codante.

Des vecteurs, selon l'invention, utilisés pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de la dystrophie musculaire, sont plus particulièrement caractérisés en ce que l'acide nucléique d'insertion est constitué de tout ou partie d'un gène sain de la dystrophine. L'introduction du gène entier de la dystrophine, ou encore de toute partie de ce gène codant pour un polypeptide conservant une activité comparable à celle de la protéine entière, peut être réalisée suivant une méthode identique à celle décrite ci-après pour l'introduction du gène de la β -galactosidase.

A titre d'exemple de pathologies autres que les pathologies musculaires, susceptibles d'être traitées dans le cadre de la présente invention, on peut citer les thromboses à l'origine des infarctus ou encore des phlébites.

Des vecteurs selon l'invention utilisés pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement des thromboses et à la prévention des infarctus et des phlébites, sont plus particulièrement caractérisés en ce que l'acide nucléique d'insertion comprend une séquence nucléotidique codant pour une substance thrombolytique. Cette dernière séquence est avantageusement précédée d'une séquence signal codant pour un peptide, signal assurant la sécrétion de la substance thrombolytique hors de la cellule musculaire.

L'invention vise également tout vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il est constitué du génome défectif d'un adénovirus, comprenant néanmoins l'ensemble de celles des séquences essentielles nécessaires à l'encapsidation de cet adénovirus, et dans lequel est inséré un acide nucléique recombinant

dont est recherchée la diffusion dans la masse musculaire, cet acide nucléique étant placé sous le contrôle d'un promoteur susceptible d'être reconnu par les polymérases des cellules musculaires, notamment le promoteur fort de la région précoce E1A du génome des adénovirus.

Un vecteur recombinant préféré de l'invention est caractérisé en ce que cet acide nucléique recombinant est constitué de tout ou partie du gène de la dystrophine.

L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant un ou plusieurs vecteurs recombinants tels que décrits ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

L'invention a également pour objet un procédé d'obtention des vecteurs recombinants décrits ci-dessus qui comprend après l'étape de construction proprement dite de ces vecteurs par introduction de l'acide nucléique d'insertion dans leur génome, une étape de transformation de lignées cellulaires transformables d'eucaryotes supérieurs (notamment d'origine humaine ou animale) comportant elles-mêmes une séquence distincte de nucléotides apte à compléter la partie du génome de l'adénovirus essentielle pour la répllication de ce dernier et dont le susdit vecteur est dépourvu, ladite séquence distincte étant de préférence incorporée au génome des cellules de ladite lignée cellulaire.

A titre d'exemple préféré de telles lignées cellulaires, on mentionnera la lignée 293, lignée de rein embryonnaire humain qui contient, intégrés dans son génome, les onze premiers pourcents de l'extrémité gauche du génome d'un Ad5. Ceux-ci permettent de compléter des virus recombinants défectifs qui portent des délétions de cette région. Un tel procédé

d'obtention est plus particulièrement décrit dans la demande de brevet européen n° 0 185 573 du 20/11/85.

Après transformation de ces lignées cellulaires, les vecteurs qui se sont ainsi multipliés sont récupérés et purifiés.

La présente invention sera plus particulièrement illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de la construction d'adénovirus vecteurs recombinants comportant le gène codant pour la β -galactosidase, et des propriétés de cet adénovirus vecteur.

1. Construction de l'adénovirus recombinant, Ad-RSV- β gal, par recombinaison in vivo.

Cet adénovirus recombinant a été construit par recombinaison homologue entre un plasmide approprié et le génome de l'adénovirus de type 5 (Ad5). Dans cette construction, le gène de la β -galactosidase est placé sous le contrôle du promoteur RSV (Rous Sarcoma Virus). Le plasmide pAdRSV β gal utilisé contient le segment PvuII de l'extrémité gauche de l'Ad5 (segment situé entre les positions 0 et 1,3 du plasmide sur la figure 1) comprenant la répétition terminale intervertie, l'origine de réplication, des signaux d'encapsidation, et l'amplificateur Ela. Ce fragment est suivi par un gène nls lacZ (décrit dans Bonnerot, C. et al., Proc. natn. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 6795-6799) codant pour la β -galactosidase, et par un fragment de l'adénovirus Ad5 situé entre les positions 9,4 et 17 du plasmide de la figure 1.

Les valeurs des positions 1,3, 9,4 et 17 indiquées ci-dessus sont des unités indiquant le nombre de paires de base comprises à l'intérieur de ces fragments, une unité représentant 360 paires de base.

La séquence d'Ad5 située entre les positions 9,4 et 17 sus-mentionnées permet la recombinaison avec

l'adénovirus dl324 traité par l'enzyme de restriction ClaI (correspondant à un mutant de délétion E3; la délétion étant effectuée entre les positions 78,4 et 84,3 du génome de l'adénovirus représenté sur la figure 1), après transfection de cellules 293 (cellules embryonnaires humaines de rein transformées par l'adénovirus et mentionnées ci-dessus) afin de générer le vecteur recombinant Ad-RSV- β gal. Le gène nls lacZ est contrôlé par le promoteur RSV LTR et possède le signal de polyadénylation du virus SV40. Le virus recombinant ainsi obtenu est incapable de se répliquer en raison de la délétion des gènes E1.

2. Etude du transfert du gène par l'intermédiaire de l'adénovirus aux organes de souris.

Des souris Balb/C âgées de 4 jours ont subi une injection intra-veineuse de 20-40 microlitres d'adénovirus recombinants hautement purifiés, Ad-RSV- β gal (10^9 unités formant des plages : UFP/ml) les organes ont été prélevés 15 jours après injection et traités avec du paraformaldéhyde 4% dans un tampon phosphate pendant 30 minutes. Après rinçage les organes ont été incubés pendant une nuit à 30°C dans une solution X-gal. Les organes entiers ont ensuite été congelés et préparés de manière appropriée pour effectuer des cryosections (de 10 micromètres d'épaisseur), sections qui ont été colorées à l'aide d'hématoxyline et d'éosine.

La mise en évidence par coloration histochimique de la manière indiquée ci-dessus de l'activité β -galactosidase sur les sections effectuées indique la présence dans les cellules des organes prélevés du gène inséré dans l'adénovirus vecteur.

L'examen macroscopique du coeur ainsi que des muscles du squelette prélevés sur ces souris traitées, révèle la grande efficacité avec laquelle a été effectué ce transfert de gène après seulement une

injection de l'adénovirus recombinant. L'intérêt du choix de la voie intraveineuse réside dans le fait que le vecteur viral n'est pas concentré dans une zone quelconque du tissu musculaire mais au contraire qu'il est favorablement dispersé dans l'ensemble de la masse musculaire. La coloration histochimique permet d'estimer que le nombre de cellules transformées atteint dans certaines zones 50 % du nombre de cellules musculaires présentes dans cette zone.

L'expression de la β -galactosidase dans le myocarde ainsi que dans les muscles du squelette est parfaitement stable. Des colorations positives ont pu être observées 15,33,55,66,90,127 et 150 jours après l'injection de l'adénovirus recombinant. L'expression du gène semble constante en fonction du temps, puisque la proportion de cellules bleues dans les tissus musculaires semblent à peu près équivalente d'un mois à l'autre.

L'analyse de fibres musculaires isolées révèle qu'une seule fibre est susceptible de présenter de nombreux "centres d'expression".

Des analyses par immunotransfert (Southern) réalisées à partir du coeur d'une souris traitée ont permis de mettre en évidence une bande intense et unique correspondant à 35 Kpb indiquant que l'ADN viral introduit dans les cellules musculaires est essentiellement extrachromosomique.

REVENDICATIONS

1. Utilisation de vecteurs recombinants d'origine virale, non répliquables, et susceptibles d'être reconnus par les récepteurs de cellules musculaires, humaines ou animales, infectables par ces virus, ces vecteurs étant en outre modifiés par un acide nucléique d'insertion contenant une séquence nucléotidique codant pour une séquence polypeptidique dont l'expression dans lesdites cellules musculaires est recherchée, cette séquence étant sous le contrôle d'un promoteur reconnu par les polymérases de ces cellules, pour l'obtention d'un médicament administrable par la voie générale, notamment intra-veineuse ou intra-artérielle, et destiné au traitement de pathologies affectant les cellules musculaires ou de pathologies dont la localisation dans l'organisme les rendent accessibles aux produits de l'expression de la séquence nucléotidique sus-mentionnée secrétés par lesdites cellules musculaires.

2. Utilisation de vecteurs selon la revendication 1, caractérisée en ce que ces vecteurs sont choisis parmi les adénovirus défectifs dont les génomes sont dépourvus de séquences essentielles nécessaires à la répllication de ces adénovirus, et plus particulièrement des transactivateurs EA et EB.

3. Utilisation de vecteurs selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que l'acide nucléique d'insertion est compris dans un génome défectif d'adénovirus comprenant néanmoins l'ensemble de celles des séquences essentielles nécessaires à l'encapsidation de ces adénovirus.

4. Utilisation de vecteurs selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'acide nucléique d'insertion est constitué de tout ou partie d'un gène sain de la dystrophine.

5. Utilisation de vecteurs selon l'une des revendications 1 à 4, pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne.

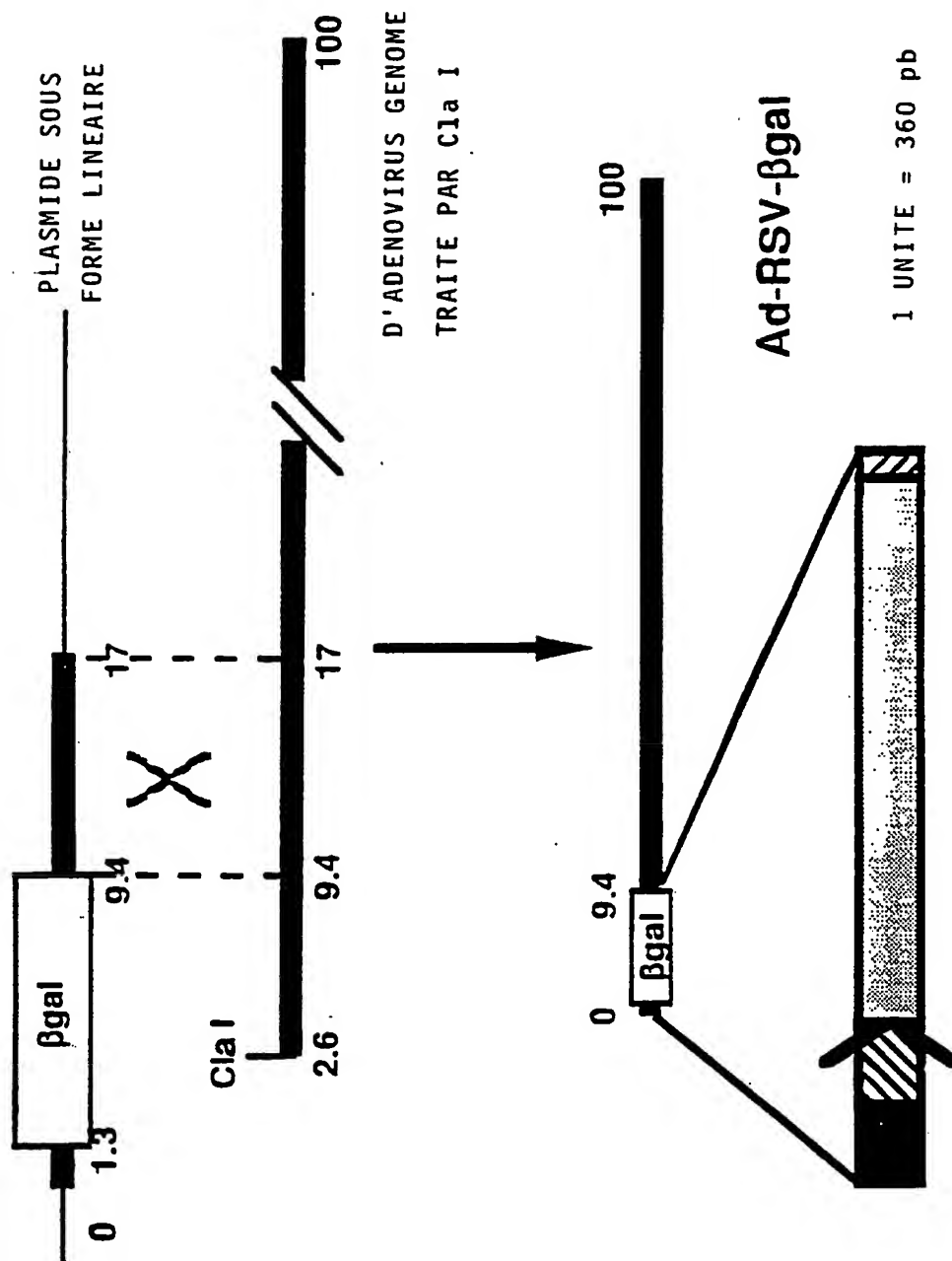
6. Utilisation de vecteurs selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour l'obtention de médicaments pour le traitement de maladies cardiaques, caractérisée en ce que l'acide nucléique d'insertion code pour une protéine ou un polypeptide ayant des propriétés thrombolytiques.

7. Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il est constitué du génome défectif d'un adénovirus, comprenant néanmoins l'ensemble de celles des séquences essentielles nécessaires à l'encapsidation de cet adénovirus, et dans lequel est inséré un acide nucléique recombinant dont est recherchée la diffusion dans la masse cardiaque, cet acide nucléique étant placé sous le contrôle d'un promoteur susceptible d'être reconnu par les polymérases des cellules musculaires, notamment le promoteur fort de la région précoce E1A du génome des adénovirus.

8. Vecteur recombinant selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'acide nucléique d'insertion code pour une protéine ou un polypeptide ayant des propriétés thrombolytiques.

9. Composition pharmaceutique comprenant un vecteur recombinant selon la revendication 7 ou la revendication 8, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

FIGURE 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 92/00898

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. 5 C12N15/86; A61K48/00; C12N15/12; C12N9/68 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. 5 C12N ; A61K ; C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	COLLOQUE INSERM (HUMAN GENE TRANSFER. INTERNATIONAL WORKSHOP) Vol. 219, 11 April 1991, PARIS, FRANCE pages 271 - 272 QUANTIN, B. ET AL. 'Adenovirus as an expression vector in muscle cells application to dystrophin' see the whole document	1-5,7
Y	COLLOQUE INSERM (HUMAN GENE TRANSFER, INTERNATIONAL WORKSHOP) Vol. 219, 11 April 1991, PARIS, FRANCE pages 51 - 61 STRATFORD-PERRICAUDET, L. & PERRICAUDET, M. 'Gene transfer into animals : the promise of adenovirus' see the whole document	1-9
X	see page 56, line 40 - page 57, line 2 see page 58, line 4 - line 45 -/-	1-5
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 January 1993 (04.01.93)		Date of mailing of the international search report 22 January 1993 (22.01.93)
Name and mailing address of the ISA European Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 92/00898

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MEISSONNIER, E. ET AL. 'Dictionnaire des médicaments vétérinaires' 1984, EDITIONS DU POINT VETERINAIRE, MAISON-ALFORT see page 97, column 2, line 35 - page 98, column 1, line 1, see page 129, column 2, line 33 - line 48</p>	1
Y	<p>WO,A,9 011 092 (VICAL, INC & WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION) 4 October 1990 see page 6, line 28 - page 8, line 6 see page 10, line 19 - page 11, line 34 see page 12, line 15 - page 13, line 2; claims 6,7,15-17; figures 2,4; examples 11-15</p>	1-5
Y	<p>WO,A,9 013 640 (THE UNIVERSITY OF NOTRE DAME DU LAC) 15 November 1990 see claims 1,6,10,12</p>	6-9
Y	<p>EP,A,0 185 573 (INSERM) 25 June 1986 cited in the application see the whole document</p>	1-9
Y	<p>WO,A,9 111 525 (THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF GLASGOW) 8 August 1991 see the whole document</p>	1-3,6-9
Y	<p>SCIENCE. Vol. 252, No 5004, 19 April 1991, LANCASTER, PA US pages 431 - 434 ROSENFELD, M.A. ET AL. 'Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha 1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo' see in particular the figure 1 see the whole document</p>	1-9

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9200898
SA 65339

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 04/01/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9011092	04-10-90	AU-A- 5344190	22-10-90
		EP-A- 0465529	15-01-92
		JP-T- 4504125	23-07-92

WO-A-9013640	15-11-90	AU-A- 5659690	29-11-90
		EP-A- 0467987	29-01-92

EP-A-0185573	25-06-86	FR-A- 2573436	23-05-86
		CA-A- 1266627	13-03-90
		DE-A- 3586092	25-06-92
		JP-A- 61158795	18-07-86

WO-A-9111525	08-08-91	AU-A- 7075691	21-08-91
		EP-A- 0512017	11-11-92

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 92/00898

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> CIB 5 C12N15/86; A61K48/00; C12N15/12; C12N9/68 </div>		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12N ; A61K ; C07K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ^o	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
X	COLLOQUE INSERM (HUMAN GENE TRANSFER. INTERNATIONAL WORKSHOP) vol. 219, 11 Avril 1991, PARIS, FRANCE pages 271 - 272 QUANTIN, B. ET AL. 'Adenovirus as an expression vector in muscle cells application to dystrophin' voir le document en entier ---	1-5,7
Y	COLLOQUE INSERM (HUMAN GENE TRANSFER, INTERNATIONAL WORKSHOP) vol. 219, 11 Avril 1991, PARIS, FRANCE pages 51 - 61 STRATFORD-PERRICAUDET, L. & PERRICAUDET, M. 'Gene transfer into animals : the promise of adenovirus' voir le document en entier	1-9
X	voir page 56, ligne 40 - page 57, ligne 2 voir page 58, ligne 4 - ligne 45 ---	1-5
-/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> ^o Catégories spéciales de documents cités:¹¹ "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée </div> <div style="width: 45%;"> "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier. "&" document qui fait partie de la même famille de brevets </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
04 JANVIER 1993	22.01.93	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	CHAMBONNET F.J.	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie °	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	MEISSONNIER, E. ET AL. 'Dictionnaire des médicaments vétérinaires' 1984 , EDITIONS DU POINT VETERINAIRE , MAISON-ALFORT voir page 97, colonne 2, ligne 35 - page 98, colonne 1, ligne 1 voir page 129, colonne 2, ligne 33 - ligne 48 ---	1
Y	WO,A,9 011 092 (VICAL,INC & WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDADATION) 4 Octobre 1990 voir page 6, ligne 28 - page 8, ligne 6 voir page 10, ligne 19 - page 11, ligne 34 voir page 12, ligne 15 - page 13, ligne 2; revendications 6,7,15-17; figures 2,4; exemples 11-15 ---	1-5
Y	WO,A,9 013 640 (THE UNIVERSITY OF NOTRE DAME DU LAC) 15 Novembre 1990 voir revendications 1,6,10,12 ---	6-9
Y	EP,A,0 185 573 (INSERM) 25 Juin 1986 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-9
Y	WO,A,9 111 525 (THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF GLASGOW) 8 Août 1991 voir le document en entier ---	1-3,6-9
Y	SCIENCE. vol. 252, no. 5004, 19 Avril 1991, LANCASTER, PA US pages 431 - 434 ROSENFELD, M.A. ET AL. 'Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha 1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo' voir en particulier la figure 1 voir le document en entier -----	1-9

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9200898
SA 65339

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets. 04/01/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9011092	04-10-90	AU-A-	5344190	22-10-90
		EP-A-	0465529	15-01-92
		JP-T-	4504125	23-07-92

WO-A-9013640	15-11-90	AU-A-	5659690	29-11-90
		EP-A-	0467987	29-01-92

EP-A-0185573	25-06-86	FR-A-	2573436	23-05-86
		CA-A-	1266627	13-03-90
		DE-A-	3586092	25-06-92
		JP-A-	61158795	18-07-86

WO-A-9111525	08-08-91	AU-A-	7075691	21-08-91
		EP-A-	0512017	11-11-92

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82